

FRUCTOSYL AMINO ACID OXIDASE GENE

Patent number: JP2002218982
Publication date: 2002-08-06
Inventor: ISHIDA HIROKI; HATA YOJI; KAWATO SHOJI; AKITA OSAMU
Applicant: NAT RES INST OF BREWING; GEKKEIKAN KK
Classification:
- International: (IPC1-7): G01N33/50; G01N33/68; C12N15/09; C12N1/15; C12N9/06; C12N15/09; C12R1/69; C12N1/15; C12R1/69; C12N9/06; C12R1/69
- european:
Application number: JP20010017640 20010125
Priority number(s): JP20010017640 20010125

Report a data error here

Abstract of JP2002218982

PROBLEM TO BE SOLVED: To mass-produce a fructosyl amino acid oxidase gene by culturing a transformant. **SOLUTION:** A fructosyl amino acid oxidase gene was cloned, and its base sequence was determined. A host (*Aspergillus oryzae*) was transformed by inserting the cloned new gene into a vector.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-218982

(P2002-218982A)

(43) 公開日 平成14年8月6日(2002.8.6)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	キーワード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/15	2 G 0 4 5
1/15		9/06	B 4 B 0 2 4
9/06		G 0 1 N 33/50	T 4 B 0 5 0
// G 0 1 N 33/50		33/68	4 B 0 6 5
33/68		C 1 2 R 1:69)	
審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2001-17640(P2001-17640)	(71) 出願人	301025634 独立行政法人 酒類総合研究所 広島県東広島市鏡山三丁目7番1号
(22) 出願日	平成13年1月25日(2001.1.25)	(71) 出願人	000165251 月桂冠株式会社 京都府京都市伏見区南浜町247番地
		(72) 発明者	石田 博樹 京都市伏見区片原町300 月桂冠株式会社 総合研究所内
		(74) 代理人	100075775 弁理士 戸田 親男
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子

(57) 【要約】

【解決手段】 フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子のクローニングが行われ、その塩基配列も決定された。また、このクローニングされた上記の新規遺伝子をベクターに挿入することにより宿主（麹菌）を形質転換した。

【効果】 形質転換体を培養することにより上記酵素を大量に生産することが可能となった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を有するフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】 配列番号2の塩基配列で示される、請求項1に記載のタンパク質をコードする遺伝子のDNA。

【請求項3】 請求項2に記載のDNAの内、少なくともコーディング領域を含んでなる組換えベクター。

【請求項4】 組換えベクターpNOFA。

【請求項5】 請求項3又は4に記載の組換えベクターを細胞に導入してなる形質転換体。

【請求項6】 *Aspergillus oryzae* MEL-FA0 (FERM P-17948)。

【請求項7】 請求項5又は6に記載の形質転換体を利用すること、を特徴とするフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有するタンパク質を生産する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子に関するものである。詳細には、麹菌（アスペルギルス・オリゼー、*Aspergillus oryzae*）より新規に単離したフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子を用いて、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼを大量に生産させ、フラクトシルアミノ酸の測定用の臨床検査試薬など様々な産業分野に利用することを可能にするものである。

【0002】

【従来の技術】 食品が加工や保存中に着色する現象は褐変現象と呼ばれている。褐変現象の中には味噌や醤油のように食品固有の色調を与えるために必要な場合もあるが、褐変は食品の外観品質を低下させ、風味の劣化を伴う場合が多く、一般的に食品にとって好ましい変化ではない。この褐変現象には酵素的反応と非酵素的反応がある。

【0003】 非酵素的反応の代表的反応機構がアミノカルボニル反応であり、メイラード反応とも呼ばれている。この反応は、アミノ酸に代表されるアミノ化合物とグルコースやマルトースに代表されるカルボニル化合物とが反応して、フラクトシルアミノ酸を包含するアマドリ化合物と呼ばれる中間体を経て、最終的に褐変性物質であるメラノイジンが生成される。さらにこのメイラード反応からはメラノイジンだけでなく、その中間物質として食品風味を劣化させる成分や物性を変化させる成分、さらには変異原活性を持つ成分などが生成されることも報告されている。従って、食品の貯蔵、保存においてメイラード反応の進行を防止あるいは低減することは、品質保持上非常に重要な対策である。

【0004】 近年メイラード反応は食品中だけでなく、生体内でも反応が進行し、人体に重大な影響を及ぼしていることが分かってきた。例えば、アルブミンやヘモグ

ロビンなどの血清蛋白は血糖とメイラード反応を起こして血清蛋白の機能低下を発症させる。このように、メイラード反応の進行状況や反応生成物は、食品だけでなく生体内を含めて広く管理する必要性が指摘されている。

【0005】 メイラード反応は、中間体が多い、中間体が不安定なものが多い、などの理由でその反応速度を定量することは非常に困難である。その中で、血清蛋白と血糖とのメイラード反応生成物であるフラクトシルアミノ酸を定量する方法が報告されている。これは血中でのメイラード反応進行の指標となり、網膜症や腎症などの血管合併症の成因診断に利用されている。

【0006】 これまでは、このフラクトシルアミノ酸の定量は、高速液体クロマトグラフィーによる方法や抗原抗体反応であるELISA法などが報告されているが、現在ではフラクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いる酵素法が主流である。この酵素法は、操作手順が簡便で液体クロマトグラフィーのような高価な分析機器を必要としない優れた方法である。またそのフラクトシルアミノ酸の酸化酵素の供給源としては、コリネバクテリウム属（特公平5-33997）、アスペルギルス属（特開平3-155780）、フザリウム属、ジベレラ属（特開平11-243950）、ペニシリウム属（特開平11-46769）などがあげられる。しかしながら、フラクトシルアミノ酸測定用酵素としての、安定性、生産性、基質特異性などすべての条件を満足する酵素は発見されていない。そして現在においても、より基質特異性が高く、より安価なフラクトシルアミノ酸オキシダーゼの探索が求められている。

【0007】 一方、麹菌アスペルギルス・オリゼーは、清酒醸造で長年使用されてきた微生物で、非常に高いタンパク質分泌能を有する。この麹菌の中に産業上有用な活性を持つフラクトシルアミノ酸オキシダーゼの遺伝子が存在すれば、麹菌での大量生産が可能であり、上記の生産性の問題と異種遺伝子発現の問題の両方を一気に解決できることが期待される。また、麹菌は液体培養から固体培養まで、酵素生産に応じて様々な培養が可能であり、各産業上の用途に合わせた酵素生産ができる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 食品中や生体中に存在するメイラード反応から生成するアマドリ化合物の一種であるフラクトシルアミノ酸の測定に役立つだけでなく、試薬その他の用途に使用できるフラクトシルアミノ酸オキシダーゼについては、従来、その供給量に問題があり、大量供給、安定供給が求められてきた。本発明者が解決しようとする課題は、新規フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子を用いて様々な産業に利用可能なフラクトシルアミノ酸オキシダーゼを効率的に生産させることである。

【0009】

【課題を解決するための手段】 本発明は、上記目的を達

成するためになされたものであって、鋭意研究の結果、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする遺伝子のクローニング及びその塩基配列の決定に成功し、更に、該遺伝子を含有した形質転換体の作成、該遺伝子の発現（しかも真核生物による高発現）、該形質転換体の培養によるフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ又はその酵素活性を有するタンパク質の製造（しかも大量製造）にも成功し、本発明の完成に至ったものである。以下、本発明について詳述する。

【0010】フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をクローニングするため、フスマ培養を行った *A. oryzae* の菌体より mRNA を調製し、この mRNA から合成した cDNA ライブラリーを構築する。このライブラリーの塩基配列を網羅的に決定し、各配列と既知遺伝子データベースとのホモロジーを検索する。これらの cDNA クローンから *Schizosaccharomyces pombe* のフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子と高いホモロジーを示すクローンを検索し、本クローンから *A. oryzae* のフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子を単離する。

【0011】単離した遺伝子はフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子であって、本遺伝子は、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする遺伝子、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、これらの遺伝子の少なくともひとつを含有する遺伝子、から選ばれる少なくともひとつを指すものである（以下、単にフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子ということもある。）。本発明においては、このようにして単離したフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子は、これを宿主に導入して発現せしめ、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ又はフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有するタンパク質を製造するものである。なお、本発明において、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有するタンパク質にはフラクトシルアミノ酸オキシダーゼも包含されるものである。

【0012】宿主としては、各種微生物が適宜使用可能であるが、本発明においては真核生物を利用することが可能であって、目的酵素を効率よく大量に生産できるという特徴を有する。真核生物、例えば麹菌 *A. oryzae* は清酒、醤油、味噌などの我が国の伝統的発酵産業で使用されてきた糸状菌である。本菌株の特徴は、上記発酵産業で有用なタンパク質を非常に大量に生産することである。本菌株が持つ高い蛋白生産能と醸造微生物としての安全性から、異種蛋白生産の宿主として注目されている（*Biotechnology*, 6, 1419 (1988)、特開昭62-272988）。本発明者らの研究から、*A. oryzae* を用いた異種蛋白生産においては、*Aspergillus* 属などの近種の遺伝子であれば、その生産能はさらに増大することが認められた。特に *A. oryzae* の遺伝子を、*A. oryzae* の高発現プロモーター制御下で発現させた

場合、非常に大量のタンパク質が生産されることを見いだした（特願平11-154271、特願2000-36754）。本発明は、この系を利用することによって、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子を麹菌で効率的に発現せしめ、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼを大量生産することにはじめて成功したものである。

【0013】上記により単離したフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子は、単独で、あるいは麹菌のチロシナーゼ遺伝子（*me10* 遺伝子：Biochem. Biophys. Acta., 1261(1), p.151, 1995）のプロモーターや固体培養において特異的に大量発現する麹菌由来のグルコアミラーゼ遺伝子（*glab*）のプロモーター（特願平11-154271、特開平11-243965）のような高発現プロモーターと共に、*A. oryzae* にて発現させて、高純度な酵素蛋白を大量に生産させるものである。

【0014】遺伝子導入方法としては常法が適宜利用されるが、例えば宿主としては、*niaD* 変異株（硝酸を還元できない麹菌変異株：Nitrate Reductase 欠損株、例えば *Aspergillus oryzae* 1013-*niaD* (FERM P-17707)）を用いる公知方法により、目的遺伝子であるフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子と形質転換用マーカー遺伝子である *niaD* 遺伝子（Unkle, E. S. et al., Mol. Gen. Genet., 218, p.99-104, 1989）を同時に導入する。この遺伝子導入の際に、ベクター配列などの異種遺伝子を排除することにより、異種遺伝子を全く含まないセルフクローニング株の形質転換体を得ることができる。また、遺伝子導入の際に、例えば *A. oryzae* 由来のグルコアミラーゼのシグナルペプチドを遺伝子工学的に連結させることにより、菌体外に大量に分泌発現する形質転換体を得ることもできる。そして、このようにして得た形質転換体を培養することにより、目的酵素を菌体内又は菌体外に大量分泌させることができる。

【0015】このように本発明によれば、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子を *A. oryzae* から単離するのに成功し、酵素蛋白を *A. oryzae* によって大量に生産させることに成功したものである。そのうえ更に、該異種遺伝子を導入する場合、*A. oryzae* 以外の異種 DNA が混入しない方法を採用することにより、セルフクローニング株となり、組換え微生物の規制からも除外されるという著効が奏される。したがって、本発明によって製造されたフラクトシルアミノ酸オキシダーゼは、工業的用途のみならず、飲食品、医薬品、化粧品等への用途も可能である。以下、本発明を更に具体的に説明する。

【0016】cDNA ライブラリーの塩基配列を網羅的に決定したデータベースより、*Schizosaccharomyces pombe* のフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子と相同性を示すクローンを抽出した。この cDNA クローンをプローブとして、

*A. oryzae*のEMBL3ファージライブラリーより、染色体のフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子を含むポジティブクローンを選択した。得られたポジティブクローンをテンプレートとして、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼのコーディング領域、プロモーター領域、ターミネーター領域を含む全長3 kbについてその全塩基配列を決定した。その結果、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子はイントロンを2個含み、遺伝子から推定されるタンパク質のアミノ酸配列は439残基であり、*Schizosaccharomyces pombe*のフラクトシルアミノ酸オキシダーゼとのホモロジーはアミノ酸レベルで33%であった。また本遺伝子のプロモーター領域には、-245 bpにはCT-rich regionの真核生物プロモーターに特徴的な配列が存在していた。

【0017】上記により決定した該遺伝子の全塩基配列を配列番号2 (図3、図4、図5) に示し、この塩基配列から推定されるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号1 (図1、図2) に示す。

【0018】次に、この遺伝子のコーディング領域を、*A. oryzae*での高発現プロモーターであるmelOプロモーター下流に連結し、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼの麹菌での高生産を検討した。*A. oryzae*の遺伝子発現ベクターにフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子のコーディング領域(ATG下流1.5 kb)を連結し(図9)、*A. oryzae*のniaD変異株に導入した。その結果、melOプロモーター制御下において対照株とは有意なフラクトシルアミノ酸オキシダーゼが菌体内に生産され、本遺伝子にはフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有する蛋白がコードされていることが確認された。

【0019】更に、本遺伝子産物の実用的供給を考慮に入れて、*A. oryzae*の菌体外へ分泌生産させることを試みた。上記発現系のmelOプロモーター下流に、*A. oryzae*由来のグルコamilラーゼ遺伝子(特願平11-154271)のシグナルペプチド領域を連結し、その直後にフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子のコーディング領域(ATG下流1.5 kb)を連結させた。これを上記の形質転換法にしたがって、*A. oryzae*のniaD変異株に導入した。その結果、melOプロモーター制御下における液体培養において対照株とは有意なフラクトシルアミノ酸オキシダーゼが菌体外に分泌生産され、最終的に0.5 g/1 L-brothの大量分泌生産が可能となった。

【0020】得られた形質転換体の内、好適なもののひとつを工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17948として寄託した。melOプロモーターの塩基配列は、配列番号5及び図8に示す。

【0021】以上の結果より、クローニングした遺伝子断片には、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有する蛋白がコードされていることが確認できた。また、

この遺伝子を用いて、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ蛋白を高分泌生産させることが可能であり、生産されたタンパク質はフラクトシルリジン、フラクトシルアラニンその他各種のフラクトシルアミノ酸の測定試薬、測定キット、研究用ないし工業用酵素剤の他様々な産業分野で応用が可能であることも確認された。以下、本発明の実施例について述べる。

【0022】

【実施例1】フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子のクローニング

液体培養から得られたmRNAによるcDNAライブラリー(ESTライブラリー)の中より、*Schizosaccharomyces pombe*のフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子に相同性の高いクローンAC3108を選択した。次にこのクローンをプローブとしてLambda EMBL3ファージを用いたアスペルギルス・オリゼーO-1013株(生命工学工業技術研究所寄託FERM P-16528)の染色体ジーンライブラリーより、フラークハイブリダイゼーション法によりフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をクローニングした。

【0023】EST配列をもとにプローブを作成するため、下記に示す2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、次いで、*A. oryzae* RIB40株のゲノムをテンプレートとしてPCRを行い、反応生成物をランダムプライムラベリング法により蛍光標識してプローブとした。上記2種類のオリゴヌクレオチドプライマーの内、一方は、センスプライマーであって、その塩基配列は配列番号3 (図6) に示され、他方は、アンチセンスプライマーであって、その塩基配列は配列番号4 (図7) に示される。

【0024】この方法により約10000個のファージクローンの中から、上記のプローブとハイブリダイズするクローンをFA66を単離した。上記のオリゴDNAをプライマーとしてジデオキシ法によりDNA塩基配列を決定し、本クローンが確かに目的のフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子であることを確認した。

【0025】

【実施例2】フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子の塩基配列の決定

ポジティブクローンFA66株をテンプレートとしてフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子の全塩基配列の決定を行なった。プロモーター部分、コーディング領域、ターミネーター部分をあわせて、3 kbの配列を決定した(配列番号2: 図3、図4、図5)。上記配列の内、1の位置から1037の位置までがプロモーター部分であり、1038の位置から2551の位置までの領域がコーディング領域であり、2552の位置から2953の位置までがターミネーター部分である。

【0026】また、*Schizosaccharomyces pombe*のフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子とのホモロジー検

索の結果から、このフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子にはイントロンが2つ存在し、そのコーディング領域は1514bpであり、塩基配列から推定されるタンパク質は、439残基であることが明らかとなった。
(配列番号1:図1、図2)。

【0027】

【実施例3】フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子の麹菌への導入

得られたフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子(faoA)の中のコーディング領域(配列番号2の1038~2551)を麹菌の高発現プロモーターであるme10プロモーター(その塩基配列を配列番号5(図8)に示す)の下流に連結した。さらに、この融合遺伝子を麹菌発現ベクターであるpIN93のPstIサイトに
(表1)

形質転換体のCzapek-Dox培地での菌体内フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ生産

フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ生産性
(U/mg-蛋白質)

対照株	ND
形質転換体	10.8

基質はε-フラクトシルリジンを用いた。

【0030】その結果、faoA遺伝子を導入した形質転換体は、菌体内に対照株とは有意に高いフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性が認められた。この結果、単離したfaoA遺伝子には、フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有する蛋白がコードされていることが確認できた。これらの形質転換体内、そのひとつをAspergillus oryzae MEL-FAOと命名し、生命工学工業技術研究所にFERM P-17948として寄託した。

【0031】

【実施例4】組み換えフラクトシルアミノ酸オキシダーゼの大量分泌生産

本遺伝子産物の実用的供給を考慮に入れてA. oryzaeの菌体外へ分泌生産させることを試みた。上記発現系のme10プロモーター下流にA. oryzae由来のグルコアミラーゼ遺伝子glab(特開平11-24

(表2)

形質転換体のCzapek-Dox培地での菌体外フラクトシルアミノ酸オキシダーゼの分泌生産

フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ生産性
(g/1L-ブロス)

対照株	ND
形質転換体	0.58

挿入したフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ発現プラスミドpNOFAを構築した(図9)。

【0028】このプラスミドpNOFAを、A. oryzaeのniaD変異株(生命工学工業技術研究所寄託FERM P-17707)に常法に従い導入した。

硝酸資化能が回復した株を遺伝子導入株として選択した。得られた遺伝子導入株を、Czapek-Dox培地にて液体培養を行い、菌体内のフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を測定した(表1)。フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性の測定は、阪井らの方法(Biosci. Biotech. Biochem., 59: 487(1995))に従い行った。

【0029】

3965)のシグナルペプチド領域(開始コドンATGを含む93bp)を連結し、その直後にフラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子のコーディング領域(ATG下流1.5kb)を連結させた。A. oryzae (Aspergillus oryzae GLB-01: FERM P-15826)由来のグルコアミラーゼ遺伝子(glab遺伝子)中のシグナルペプチドをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号6(図10)に示す。

【0032】これを上記の形質転換法にしたがって、A. oryzaeのniaD変異株に導入した。その結果、me10プロモーター制御下における3LのCzapek-Dox培地を用いた液体培養において対照株とは有意なフラクトシルアミノ酸オキシダーゼが菌体外に分泌生産され、最終的に0.6g/1L-brothの高純度で大量分泌生産が可能となった(表2)。

【0033】

基質はε-フラクトシルリジンをを用いた。

【0034】

【発明の効果】本発明により、麹菌のフラクトシルアミノ酸オキシダーゼを大量に生産・分泌することがはじめて可能となり、従来活用が困難であったフラクトシルアミノ酸の定量に利用することができる。また本フラクトシルアミノ酸オキシダーゼは各種フラクトシルアミノ酸を酸化することができるので試薬としてもきわめて有用である。

【0035】フラクトシルアミノ酸としては、次のものが例示される：フラクトシルグリシン、フラクトシルアラニン、フラクトシルバリン、フラクトシルロイシン、フラクトシルセリン、フラクトシルトレオニン、フラク

トシルシステイン、フラクトシルシスチン、フラクトシルメチオニン、フラクトシルアスパラギン酸、フラクトシルグルタミン酸、フラクトシルリシン、フラクトシルアルギニン、フラクトシルフェニルアラニン、フラクトシルチロシン、フラクトシルヒスチジン、フラクトシルトリプトファン、フラクトシルプロリン、フラクトシルオキシプロリンその他。

【0036】また、本発明は麹菌の酵素を麹菌で生産させるため、生産される酵素蛋白は非常に安全性が高く、食品、医薬品、化粧品産業などへも応用が可能な画期的な技術である。

【0037】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<;110>:      Gekkeikan Inc., Ltd.
<;120>:      Fructosyl Amino Acid Oxidase Encoding Gene
<;130>:      6371
<;141>:      2001-1-25
<;160>:      6
<;210>:      1
<;211>:      439
<;212>:      PRT
<;213>:      Aspergillus oryzae
<;400>:      1
Met Ala Leu Pro Pro Lys Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly Val Phe Gly
  1              5              10              15
Leu Ser Thr Ala Leu Ser Leu Ser Arg Arg His Pro Thr Ser Glu Val
              20              25              30
Thr Val Leu Glu Ala Ser Pro Ile Ile Pro Asn Pro Glu Gly Ser Ser
              35              40              45
Val Asp Ala Ser Arg Ile Val Arg Ala Asp Tyr Ser His Pro Val Tyr
              50              55              60
Thr Lys Leu Ala Asp Ala Ala Ile Glu Arg Trp Arg Asn Thr Glu Trp
              65              70              75              80
Gly Ala Glu Asp Asn Arg Tyr Ile Gln Ser Gly Leu Leu Leu Val Tyr
              85              90              95
Pro Glu Gly Asn Thr Asn Gly Lys Glu Tyr Ala Arg Lys Ser Tyr Asn
              100              105              110
Asn Val Lys Glu Leu Gly Asn Asp Val Glu Leu Leu Pro Ser Lys Lys
              115              120              125
Asp Val Leu Arg Val Ala His Ala Tyr Gly Glu Glu Leu Asn Val Ala
              130              135              140
Gly Gly Tyr Val Asn Trp Gly Ser Gly Trp Ser Asp Ala Glu Ala Gly
              145              150              155              160
Val Arg Tyr Ala Lys Lys Leu Leu Asp Thr Glu Gly Lys Val Thr Phe
              165              170              175
Lys Thr Gly Glu Val Lys Ser Leu Leu Tyr Ala Asp Gln Ser Ala Gly
              180              185              190
Ala Ser Gln Arg Lys Val Thr Gly Val Leu Leu Glu Asp Gly Ser Ser

```

195 200 205
 Leu Thr Ala Asp Leu Val Val Leu Ala Thr Gly Ala Trp Thr Gly Lys
 210 215 220
 Leu Val Asp Leu Arg Gly Arg Ala Leu Ser Thr Gly Gln Ala Val Ala
 225 230 235 240
 Phe Val Gln Ile Ser Asp Glu Glu Gln Arg Arg Leu Glu His Met Pro
 245 250 255
 Thr Ile Leu Asn Phe Ala Thr Gly Phe Phe Ile Ile Pro Pro Arg Lys
 260 265 270
 Asn Leu Leu Lys Ile Ala Arg His Ala Tyr Gly Tyr Ile Asn Pro Lys
 275 280 285
 Asn Val Pro Val Pro Gly Val Glu Gly Glu Thr Met Gln Val Ser Leu
 290 295 300
 Pro Glu Pro Gly Val Pro Val Pro Leu Glu Gly Glu Glu Ala Leu Arg
 305 310 315 320
 Ser Ala Leu Arg Asn Leu Leu Pro Ser Met Gly Asp Arg Pro Phe Ile
 325 335 330
 His Thr Arg Val Cys Trp Tyr Thr Asp Thr Pro Glu Gly His Phe Ile
 340 350 345
 Ile Thr Tyr His Pro Asp His Ser Asn Leu Phe Leu Ala Thr Gly Gly
 355 360 365
 Ser Gly His Gly Tyr Lys Phe Leu Pro Val Leu Gly Asp Lys Ile Val
 370 375 380
 Asp Ala Met Glu Gly Lys Leu Glu Pro Glu Leu Ser Glu Ile Trp Lys
 400 385 390 395
 Trp Pro Ala Ala Val Glu Gly Glu Phe Glu Gly Asp Gly Ser Arg Ser
 405 415 410
 Gly Pro Lys Gly Leu Arg Leu Met Asp Glu Leu Ala Lys Thr Lys Lys
 420 425 430
 Ala Gln Arg Lys Gly Val Leu
 435 439

<:210>: 2

<:211>: 2953

<:212>: DNA

<:213>: Aspergillus oryzae

<:400>: 2

cgtttcttcc cccattcgca tagctttctca gatattctga catctgcgtc aaaagctcct 60
 agctgtctga ttgtatcgat ccgatacatc cctaggcaacg tccatagact gtgcatgggt 120
 cacttcccggt ctgtaggagg cgtatagata cccacagtat gtgctcatgc cgaggacacc 180
 gaccctctaga atggctcatca ctttgggaga catgcgggggt tgtgtctctt ggagattcag 240
 gagatgtggg ttagcccgct tcggcaaccg cgatgctgct ggcggcttct tgctgttgag 300
 acggttagat aaactagett tcttatacat ctaccaggga gagggcgact gttcccgga 360
 gtatgctgca cggtcacag cgattgaagg gagcatcata tactgaccca gaaccatcaa 420
 ctggaattctt actgccggtc cttttaggac cggtaacagg cactttggcc tttagcggg 480
 cccggcctac tcgagacggc ctcattgctga gagattaaag ggcgtcggat gtgataatca 540
 tacgatgttc attcaattgc cgtggttttg aagatcctcg ggccgatata tatcctttct 600
 cggaaaagggt tgacaaacgt ccagttgaga gtctatttaa taacaaacaa aatcaccgtt 660
 caacacatga tggatcaatgc atatttgata ctattggggt atatcaagtt atcaacatat 720
 gatttcccggt ggtattagtc gaccaacaag ggtgtattga gttggttgaa tcgggagttg 780
 cggccgagaa ccaaaaaaaaa agaaaaaaaa aaagagctaa gctaagaacg ataggagcct 840

```

atcaattgtc atatcgccaa cttaatcttt ggtccacggt gctcctatat cgtccgaac 900
atggagccac tattctttta aaggcccc agacttctct ctccgcacct ttctgtttct 960
gtatecattt tgcaggaaaa ggtgcaacgg agtagttctt ttctcaaaga gatcattcca 1020
gtacaacggt atcagacatg gctttaccac ccaaaatcct catcgtaggt ggaggtgtct 1080
tcggatgtga gtgatggaca cactgagctg gtattcccta atcttgcttt ttgttcttga 1140
attttacaca agcgcaatgc cattggctcc taacatacta ccgttgggat ttcacggtca 1200
ctgattctct ttccaaccac acagtatcca ccgcccctct actttcccgg aggcattccaa 1260
caagcgaagt gaccgttcta gagcgctcgc ctataatccc caacctgaa ggctcctcag 1320
ttgacgcctc acgcatcgtt cgcgctgact actcgcaccc tgtttacag aaactcgcag 1380
acgcagctat tgagcgttg cgtaacaccg aatggggcgc cgaagataac cgatacatcc 1440
agagcggact acttctcgtc taccagaag gaaacaccaa tggcaagaa tacgccagga 1500
agagctacaa caacgttaag gagctaggaa acgatgtcga gctactgcca tccaaaaaag 1560
acgttctcgc ggtggcgcac gctacgggg aggaattgaa tgtggcgggt ggctacgtga 1620
attgggggtc aggctggctg gacgccgaag ccggagtctg atatgcgaag aagcttctcg 1680
acaccgaggg caaggtcacc ttcaaacgg gggaagtcaa gagcctctct tatgcagacc 1740
aatctgccg tgcctctcag cgcaagtgta ctggtgttct cttggaagat ggatcctccc 1800
tcacggccga tctggtcgtt cttgcgacgg gtgcttgga gggtaaagctc gtcgacctcc 1860
gcggccgggc cctctcaaca ggcaggcgg ttgcgttctg ccagatctcc gacgaggagc 1920
agcggcgact ggagcacatg cctactatcc tcaacttctg gacaggttct ttcattatcc 1980
cgccccgcaa aaacctgttg aagatcctc gtcacgcta ccgctatata aatcccgaag 2040
atgtgcctgt tcccgggtgc gagggagaaa cgatcgaagt cagtttgcg gaacccgggg 2100
tcccagttcc gctagaagcc gaagaagctc tgagatccgc cttgagaaat ctgctacct 2160
gcatgggtga ccggcccttc atccacactc gactctctg gtacacagac acgtaagtcg 2220
actctagaaa ctcatagtgg gaacgcggga aagctaacaa aaaaccagac ccgaaggtca 2280
cttcattcatc acttatcatc ccgaccttc gaatctctc ctcgctacgg gtggcagtgg 2340
gcacgggtac aagttcctcc csgtctctcg ggacaagatc gtcgatgcca tggaaaggaa 2400
acttgagccg gagctgagcg agatttgaa atggccggcg gctgtagagg gcgagtttga 2460
aggtgatgga agccggctg gtccgaaggg cttgcggttg atggacgagc tggccaaaac 2520
caagaaagca cagcgaagg gcgtcctgta attgggtggt actaaaactg cacataagat 2580
ataccctgt agatatacct tgtataaaaa agcccaataa aactgtctaa cttaaaacag 2640
ttttgaaatg tacgaaggat accgatctgt tcattcccgc aataaggctg caaggacggt 2700
gcgtgatcta tatataaac agcgtgtct acgtgatttg taggaacgcg ttgcatggt 2760
tttcactcca ttgttcag aggtatcga gtaaaattaa aaaaaaatc gtgccacaaa 2820
aaaccaggtt cattgcctga ttaccaacc agccagtca ttcgtccact ttcgttcaaa 2880
ggtctagagg aatattgcag taattttct tctatctga tccgtcatct tctgcaagag 2940
tcgtgaaac aaa 2953

```

<;210>: 3

<;211>: 23

<;212>: DNA

<;213>: Artificial Sequence

<;400>: 3

gacgggtaag ctgctgacc tcc

23

<;210>: 4

<;211>: 23

<;212>: DNA

<;213>: Artificial Sequence

<;400>: 4

cccgtgccca ctgccaccg tag

23

<;210>: 5

<;211>: 1173

```

<:212>:      DNA
<:213>:      Aspergillus oryzae
<:400>:      5
gcttgcccttg gctcaaatcg ttcattgacac ccatctagge catggcgccct gtagagcagg      60
ttacatttca tggccggtta atccgaatcc agtgcttgca catgtagcgc cacatggctct      120
gtgctattct attctgtgtt ataatagtgt gatttattgc gtttggcgt ttcagttgat      180
tcgactggcc ttgcacatta ctctcgcatc ccacagctgg ctggaggagt tatctttact      240
tcttctttgt gactgtggtt gcatgaggcg cttagtatac tatcagctga tactatgttg      300
aaactgaatc acggtgcttg aaggtctgcg tgaagtgtt cattggcgtg tgatattaac      360
cgcagcctgt ctagaactat gactagacgg agcgccaaga atggacgaca acaggaatac      420
tgcccagcta gccacagctg aatcctaaag aagtttgcca gccctcgat tcctatcctg      480
catggacggc aacattgccc tgacgagcta aattaggccg cagcgctagt attagaatga      540
actacggtag caatgagggg aacgcccaca agccaattaa cagcgctagt cttgatatga      600
cgggcttagc cttaattacg gsgtactgtg aggacgttgt gcctgctgca attgtctatc      660
cgtgccgacg gtgttgacag ccactagcca ttcagctcgc cacactttca accccacacc      720
tcaaagtaag acctaaactt attttggact tccttgacgc tactatgctg tcaactgttat      780
ttgactggac atgacatgca gtatcatggc gccataaag agagtatctc gagagtttca      840
ttgcatcgta ggaaggcctt gcattccggt gttgccggga aagggatcat tggtaatgag      900
tagttgtttt gtctagctgt gatgccgggc ttgatggac ggaggacctg gactgcagct      960
cttcacgcaa agcccagat agactgattt gtaacatgtg tgatgcgtat cattcattat      1020
caatacgtct cgtggatatt taagaaggcg gacagctcgt tgaatatccg ctacttcaag      1080
ttcaaacat cattctacg aaaaggaaaa ccacagcttc cgcttcaaag ccctagtcaa      1140
cactagttca tcttctgatt actttggttc aca                                     1173
<:210>:      6
<:211>:      93
<:212>:      DNA
<:213>:      Aspergillus oryzae
<:400>:      5
atgcggaaca accttctttt ttccctcaat gccattgctg gcgctgtcgc gcatccgtcc      60
ttccctatcc ataagaggca gtcggtatcc aac                                     93

```

【図面の簡単な説明】

【図1】フラクトシルアミノ酸オキシダーゼのアミノ酸配列を示す。

【図2】同上続きを示す。

【図3】フラクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子の塩基配列を示す。

【図4】同上続きを示す。

【図5】同上続きを示す。

【図6】センスプライマーを示す。

【図7】アンチセンスプライマーを示す。

【図8】me10プロモーターの塩基配列を示す。

【図9】麹菌発現プラスミドpNOFAの構築及びその制限酵素地図を示す。

【図10】glab遺伝子のシグナルペプチド(998の位置からはじまるATG-1090の位置で終わるAAC)をコードする遺伝子の塩基配列の塩基配列を示す。

【図5】

```

tttcactcoa ttggtocag aggtatcga gtaaaattaa aaaaaaatc gtgcacaaaa      2820
aaaccaggtt cattgcctga ttcaccaacc agccagtga ttcgtccact ttcgttcaaa      2880
ggtctagagg aatattgcag taatttttct tcctatctga tccgtcatct tctgcaagag      2940
tcgtgaaaac aaa                                     2953

```

【図1】

Met Ala Leu Pro Pro Lys Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly Val Phe Gly
 1 5 10 15
 Leu Ser Thr Ala Leu Ser Leu Ser Arg Arg His Pro Thr Ser Glu Val
 20 25 30
 Thr Val Leu Glu Ala Ser Pro Ile Ile Pro Asn Pro Glu Gly Ser Ser
 35 40 45
 Val Asp Ala Ser Arg Ile Val Arg Ala Asp Tyr Ser His Pro Val Tyr
 50 55 60
 Thr Lys Leu Ala Asp Ala Ala Ile Glu Arg Trp Arg Asn Thr Glu Trp
 65 70 75 80
 Gly Ala Glu Asp Asn Arg Tyr Ile Gln Ser Gly Leu Leu Leu Val Tyr
 85 90 95
 Pro Glu Gly Asn Thr Asn Gly Lys Glu Tyr Ala Arg Lys Ser Tyr Asn
 100 105 110
 Asn Val Lys Glu Leu Gly Asn Asp Val Glu Leu Leu Pro Ser Lys Lys
 115 120 125
 Asp Val Leu Arg Val Ala His Ala Tyr Gly Glu Glu Leu Asn Val Ala
 130 135 140
 Gly Gly Tyr Val Asn Trp Gly Ser Gly Trp Ser Asp Ala Glu Ala Gly
 145 150 155 160
 Val Arg Tyr Ala Lys Lys Leu Leu Asp Thr Glu Gly Lys Val Thr Phe
 165 170 175
 Lys Thr Gly Glu Val Lys Ser Leu Leu Tyr Ala Asp Gln Ser Ala Gly
 180 185 190
 Ala Ser Gln Arg Lys Val Thr Gly Val Leu Leu Glu Asp Gly Ser Ser
 195 200 205
 Leu Thr Ala Asp Leu Val Val Leu Ala Thr Gly Ala Trp Thr Gly Lys
 210 215 220
 Leu Val Asp Leu Arg Gly Arg Ala Leu Ser Thr Gly Gln Ala Val Ala
 225 230 235 240
 Phe Val Gln Ile Ser Asp Glu Glu Gln Arg Arg Leu Glu His Met Pro
 245 250 255
 Thr Ile Leu Asn Phe Ala Thr Gly Phe Phe Ile Ile Pro Pro Arg Lys
 260 265 270

【図6】

【図7】

5' - GACGGGTAAGCTCGTCGACCTCC -3' 5' - CCCGTGCCCACTGCCACCCGTAG -3'

【図2】

Asn	Leu	Leu	Lys	Ile	Ala	Arg	His	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Lys
275							280					285			
Asn	Val	Pro	Val	Pro	Gly	Val	Glu	Gly	Glu	Thr	Met	Gln	Val	Ser	Leu
290						295					300				
Pro	Glu	Pro	Gly	Val	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Gly	Glu	Glu	Ala	Leu	Arg
305					310					315				320	
Ser	Ala	Leu	Arg	Asn	Leu	Leu	Pro	Ser	Met	Gly	Asp	Arg	Pro	Phe	Ile
			325						330					335	
His	Thr	Arg	Val	Cys	Trp	Tyr	Thr	Asp	Thr	Pro	Glu	Gly	His	Phe	Ile
		340						345					350		
Ile	Thr	Tyr	His	Pro	Asp	His	Ser	Asn	Leu	Phe	Leu	Ala	Thr	Gly	Gly
	355					360					365				
Ser	Gly	His	Gly	Tyr	Lys	Phe	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Asp	Lys	Ile	Val
370					375						380				
Asp	Ala	Met	Glu	Gly	Lys	Leu	Glu	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Ile	Trp	Lys
385					390					395				400	
Trp	Pro	Ala	Ala	Val	Glu	Gly	Glu	Phe	Glu	Gly	Asp	Gly	Ser	Arg	Ser
				405					410					415	
Gly	Pro	Lys	Gly	Leu	Arg	Leu	Met	Asp	Glu	Leu	Ala	Lys	Thr	Lys	Lys
			420					425					430		
Ala	Gln	Arg	Lys	Gly	Val	Leu									
	435				439										

【図3】

cgcttcttcc	ccattcgca	tagcttctca	gatattctga	catctgcgtc	aaaagctcct	60
agctgtctga	ttgtatcgat	ccgatacatc	cctaggcaog	tccatagact	gtgcatgggt	120
cacttccogt	ctgtaggagg	cgtatagata	ccacagtat	gtgctcatgc	cgaggacacc	180
gaccocctaga	atggtcacat	ctttgggaga	oatgcggggg	tgtgtctctt	ggagattcag	240
gagatgtggg	ttagcccgct	tcggcaaccg	cgatgctgct	ggoggcttct	tgctgttgag	300
acggttagat	aaactagctt	tattatacat	ctaccagga	gagggcgact	gttccoggaa	360
gtatgctgca	cggctcacag	cgattgaagg	gagcatcata	tactgaccca	gaaccatcaa	420
ctggaatctt	actgccggtc	cttttaggac	cgtaacagg	cactttggcc	tttagcgcg	480
ccggccctac	tcgagacggg	ctcatgctga	gagattaaag	ggcgctggat	gtgataatca	540
tacgatgttc	attcaattgc	cgtggttttg	aagatcctcg	ggccgatata	tatcctttct	600

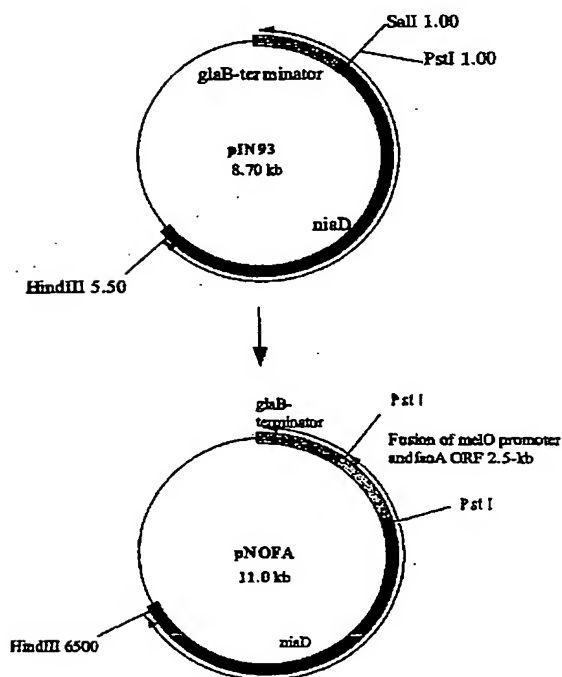
【 図 4 】

cggaagaggt	tgacaaacgt	ccagttgaga	gtctatttaa	taacaaacaa	aatcaccgtt	660
caacacatga	tggtcaatgc	atatttgata	ctattggggt	atatcaagtt	atcaacatat	720
gatttcccg	ggtattagtc	gaccaacaag	ggtgtattga	gttgggtgaa	tggggagttg	780
oggcogagaa	ccaaaaaaa	agaaaaaaa	aaagagctaa	gctaagaaog	ataggagcct	840
atcaattgtc	atatacgcaa	ctaaatcttt	ggtccacggg	gtcctatat	ogtccgaac	900
atggagccac	tattctttta	aagggtcccc	agacttctct	ctccgcacct	ttctgtttct	960
gtatccattt	tgaggaaaa	ggtgcaacgg	agtagttctt	ttctcaaaga	gatcattcca	1020
gtacaacggg	atcagacatg	gctttaccac	ccaaaatcct	catcgtaggt	ggagggtgtc	1080
tgggatgtga	gtgatggaca	cactgagctg	gtattcccta	atcttgcttt	ttgttcttga	1140
attttacaca	agcgcaatgc	cattgggtcc	taacatacta	ccgttgggat	ttcacgggtca	1200
ctgattctct	ttccaaccac	acagtatcca	ccgccctctc	actttccggg	aggcatccaa	1260
caagcgaagt	gaccgttcta	gaggcgctgc	ctataatccc	caacccctgaa	ggctcctcag	1320
ttgacgcctc	acgcacgtgt	cgcgctgact	actcgacccc	tgtttacacg	aaactcgacg	1380
acgcagctat	tgagcgctgg	cgtaacaccg	aatggggcgc	cgaagataac	cgatacatcc	1440
agagcggact	acttctcgtc	taocccagaag	gaaacaacca	tggcaaagaa	tacgccagga	1500
agagctacaa	caacgttaag	gagctaggaa	acgatgtoga	gctactgcca	tccaaaaaag	1560
acgttctgcg	ggtggcgcaac	gcctacgggg	aggaattgaa	tgtggcgggt	ggctacgtga	1620
attgggggtc	aggctggtcg	gacgcgcaag	ccggagttcg	atatgogaag	aagcttctcg	1680
acaccgaggg	caagggtcac	ttcaaaacgg	gggaagtcaa	gagcctcctc	tatgcagacc	1740
aatctgccgg	tgctctcag	cgcaagggtga	ctgggtgtct	cttgggaagat	ggatcctccc	1800
tcacggccga	tctggtcggt	cttgcgacgg	gtgcttgga	gggtaagctc	gtcgacctcc	1860
gcgggcgggc	cctctcaaca	ggccaggcgg	ttgctgtcgt	ccagatctcc	gacgaggagc	1920
agcggcgact	ggagcacatg	cctactatcc	tcaacttcgc	gacaggtttc	ttcatcatcc	1980
cgccccgcaa	aaacctgttg	aagatcgctc	gtcacgccta	cggctatata	aatcccaaga	2040
atgtgcctgt	tcccgggtgc	gagggagaaa	cgatgcaagt	cagtttgccg	gaaccggggg	2100
tcccagttcc	gctagaaggc	gaagaagctc	tgagatccgc	cttgagaaat	ctgctaccta	2160
gcatgggtga	ccggcccttc	atccacactc	gagctctctg	gtacacagac	acgttaagtcg	2220
actctagaaa	ctcatagtgg	gaacgcggga	aagctaacaa	aaaaaccagac	cgaagggtca	2280
cttcatcatc	acttatcatc	ccgaccattc	gaatctcttc	ctcgctaagg	gtggcagtg	2340
gcacgggtac	aagttcctcc	cgtgctcgg	ggacaagatc	gtcgatgcca	tggaaaggaa	2400
acttgagccg	gagctgagcg	agatttgaa	atggccggcg	gctgtagagg	gcgagtttga	2460
aggtgatgga	agccggtctg	gtccgaagg	cttgcggttg	atggacgagc	tggccaaaac	2520
caagaaagca	cagcggaagg	gcgtcctgta	attgggtggg	actaaaactg	cacataagat	2580
ataccctgt	agatatacct	tgtataaaaa	agcccaataa	aactgtctaa	cttaaaacag	2640
ttttgaaatg	tacgaaggat	accgatctgt	tcattcccg	aataaggctg	caaggacggg	2700
gcgtgatcta	tatatacaac	agcgtgtct	acgtgatttg	taggaacggg	tttgcattgg	2760

【図8】

gcttgccttggtcaaatacgttcatgacacccatctaggccatggcgccctgtag
 agcaggttacatttcatggccgggttaatccgaatccagtgccttgacatgtagc
 gccacatggtctgtgctattctattctgtgttataatagtgtgatttattgcgt
 ttgggcgtttcagttgattcgactggccttgacattactctcgcattccacag
 ctggctggaggagttatctttacttcttctttgtgactgtggctgcatgaggcg
 cttagtatactatcagctgatactatgttgaaactgaatcacgggtgcttgaagg
 tctgcgtgaagtgggttcattgggctgtgatattaaccgcagcctgtctagaact
 atgactagacggagcgccaagaatggacgacaacaggaatactgcccagctagc
 cacagctgaatcctaagaagtgttggccagccctcgtattcctatcctgcatgga
 cggcaacattgcccctgacgagctaaattaggccgcagcgtagtattagaatga
 actacggtagcaatgaggggaacgcccacaagccaattaaacgtccctttcttg
 atatgacgggcttagccttaattacgggggtactgtgaggacgttgtgectgctg
 caattgtctatccgtgcccagcgggtgttgacagccactagccattcagctcgcca
 cactttcaacccccacacctcaaagtaagacctaaacttattttggacttccttg
 cagctactatgctgtcactgttatttgactggacatgacatgcagtatcatggc
 gccataaagagagtatctcgagagtttcattgcatcgtaggaaaggcttgcatt
 tccggtgttgcggggaagggtatcattggtaattgcgtagttgtttgtctagct
 gtgatgccgggctttgatggacggaggacctggagtgcagctcttcattgcaaag
 cccgagatagactgattttgtaacatgtgtgatgcgtatcattcattatcaatac
 gtctcgtggatatttaagaaggcgacagtcgtgtgaatatccgctaacttcaag
 ttcaaaacatcattcctacgaaaaggaaaaccacagcttccgcttcaaagccct
 agtcaacactagttcatcttctgattacttttggttcaca

【図9】



【図10】

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GTAGTATTCTGCACTGGTATGGAACCTCCCAAGCCAGGCTAGCTAAATCACTCCTAGACTATTCTTAGAGTAGATTCAACAGTCGTACTTGCAAGG
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GTTTCTGTGGAAAAGAACCAACAGTCGAAGTGTGGAGGTGATGTGATGACGTCGAAGAGATGGATGAGTCATAAGTCATGAACCTTGTGGTTCTT
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAACTTCTCCACATCTCACTTNCAGGTACCCGAGGATAATCCAAGGAGCTCTATGGCTATAGCTGTACGAGTGTACGGCATGCCGTATTCACTCAAGC
310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TAACCTAACCAATACAAAACGGCAGCACATGCCSATGCATAATGGGAGCTCAAGACATTATCGTGTCCGGCCAAATGGCGGCAATGGCCATTCAACG
410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
AACTTGGGCACTCTATCTCAAACGATGAGACCTTTACTTGGCATAGGAAAGATTGTTAATGGGTGAAGCATGCTCCTAGTTGTATGGCCGATGTGCTCC
510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
CCGATCAACCAAGGTTTGTACATCACTCCACTCCGCCGATCTGGCTTAACCTAAACACAGTCAAGAAATAAGTCCGCTTCTAAGGACATTAA
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
GACTCGACTAGGACTCAGAGGTTTCACTCCGATGGGGTTTCCACAGTGAGAACTAAGAGAAATGGCGGACGGGCAGATGTGGGATGATCACTTTAGTC
710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
GCTCCGACCAATATCGATTCAATTTGGATCCGCCACGCTGCTCCCGAAATTAATACCGGATCTGCTTCATGATGGGGCTTTGGCTCGGGAAGTCTG
810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
CTGCGAGTCTCAGTAATCTCCGACTGATCGGCCGCTGCTGTGTTAATGTGATGCGGCCGCTTGGCGATCGGTTCACTGAATATCTACGTTACGTC
910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
TAGGTCCGCTATAAAGAGACTGAAATTTCACTTCGAATGAGGAGCCAAACACAGTACAGTCATTCTTGTCTTGGAAAGTACACCATCATG
1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
CGGAACAACCTCTCTTTCTCCCTCAATGCCATTGCTGGCGCTGTGCGCATCCGCTCTTCTATCCATAAGAGGAGTGGATCTCAACGCCCTTCATTG
1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
AGGCACAGACACCEATCGCCAAACAGGGGCTCCTCAATATATCGCGCTGATGGCAAGCTTGTGAGGGGCTGCCGCTGGTATCGTTGAGCCTCCCC
1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
ATCCAAAGATATCCGACTGTTCTGATACATCCTACCCTCAAGACCGCATGATATTACCACAGAGCTAACTATATAGACTTTACACCTGGAGCGCGG
1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
ACGCTGCGCTCACCATGGAAAGAGTGATAGCAATTCAATCGGGGAGAGATGCGACTCTCGAGTCCACAATCCAGAAATTATGTTGACTCTCAAGCCGAACGA
1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
GCAGGAGTCTCAACCCATCAGGCGGCTGTGGATGGCTCGGCTCTGCTGAACCCAAATTTACGTCAATATCTCTCAATTACCGATTCTGGGGC
1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
CGACCCAGCGCGAGCGGCGCAGCTTACGTGCTTCCGCTTGTATGCGATATGGCAACTCTCTGATTCCAGCGACAACCAATCTGTTGTCAAAGCTAACA
1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700
TCTGGCATTGTCCAGAAATGACTTGTCTTATGTGGTCAATACTGGAACAGACCGGTTTGTCTTTGGGAAGAGGTTCAGGCGAGCTCTTCTTCAAC
1710    1720    1730    1740    1750    1760    1770    1780    1790    1800
TGTGCTGTGTCAGCACAAAGCCTTGGTGGAGGGCGATGCGTTTGCAAGGCACTCGGAGAGGAATGCCAGGATGCTCCGTGGCGCCTCAATCTCTGTC
1810    1820    1830    1840    1850    1860    1870    1880    1890    1900
CATCTTCAGGACTCTGGAATGGGTCTGCTGTTCTTTCTAACTTACCAACCAATGGGCGAGTGGATGGATACCAACTCTCTTTGGGCTCATTACACA
1910    1920    1930    1940    1950    1960    1970    1980    1990    2000
CTTTTGTGTCAGCGCGCTTGTGATGATACAACTTCCAGCCCTGCTCTCTCGCGCCTGTCGAACATAAGCTTGTGGTGACTCTTTCCGGTCTGGT
2010    2020    2030    2040    2050    2060    2070    2080    2090    2100
CTACGGTATCAACAATGGAGTGGAGCAGGAAAGGCCGCGGAGTGGCCCTGACGAGAGGACCTATCAGGAGGCAATCCATGTTGGTACTCTGT
2110    2120    2130    2140    2150    2160    2170    2180    2190    2200
CTCATATCCAAAGCTTAACTAATGAATATTAGGTATCTTACCACCTGGTGGCTGGGAATTGCTCTACGACGCTTGTATCAGTGGGCAAAACAAGGT
2210    2220    2230    2240    2250    2260    2270    2280    2290    2300
CAAGTGAAGTCACTGAAACTTCCCTTCCCTTCTCAAGGACCTCTCCAGCAATGTACCACCGGATCTACGCCAAGTCTTCTCAGCTTATGAGTCGC
2310    2320    2330    2340    2350    2360    2370    2380    2390    2400
TTACGAGCGCTGTCAAGACCTACGAGACGGCTTCACTCTCGTGTCTCAGGAGTAACTCCGATGGCGGTGCTTGGCTGAGCAGTACAGTCGGGACCA
2410    2420    2430    2440    2450    2460    2470    2480    2490    2500
GGGCACCCAGTTTGGCATCCGATGCTTGGTCTTATGCACTTTCTTGAGTGCTGTTGGACGACGAAACGGCACTGTCCCTGCTAGCTGGGGCTCT
2510    2520    2530    2540    2550    2560    2570    2580    2590    2600
TCCAGGCGCAACGAGTCCAAGCAATGTTGGGGGTACAGTTCTGGAAGTACACTACCCCAACTGTTGGTGGTGGTATGATGCTTTCAGTGC
2610    2620    2630    2640    2650    2660    2670    2680    2690    2700
GTGTAGTCTACTCTGACCTCGTGTACGATTGTTGCTTTTGCCTGTCTAAATGCGACGCTGCTGTCATGTTGTTAACTACTGCTTCTTCTTGT
2710    2720    2730    2740    2750    2760    2770    2780    2790    2800
CAACAACAAGATTACATCAATTAGTCTAGCTAGACAATAACTTTACAGTTGCAAGCTTAGTCTAGTATTATACATCTCACCGGACTCTCTTCAAC
2810    2820    2830    2840    2850    2860    2870    2880    2890    2900
TTACGGGGTAACCAAGAAAGTAACAAGACTAAGCCTATTGATCTGTTCTAATCTTATTTAGTTTCTGTACGCTCAATGCAATCAAACTAAG
2910    2920    2930    2940    2950    2960    2970    2980    2990    3000
TATACATACTACATCTAGTATCTACACCTATCTCTTCAACCTAGAACCTCCGCTAGGTATGACTGTAGATCGATTATCCGGAGATTCCCGCCAC

```

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テーム (参考)
(C 1 2 N 15/09	Z N A	(C 1 2 N 1/15	
C 1 2 R 1:69)		C 1 2 R 1:69)	
(C 1 2 N 1/15		(C 1 2 N 9/06	B
C 1 2 R 1:69)		C 1 2 R 1:69)	
(C 1 2 N 9/06		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:69)		C 1 2 R 1:69)	
(72) 発明者 秦 洋二		(72) 発明者 秋田 修	
京都市伏見区片原町300 月桂冠株式会社		広島県東広島市鏡山3丁目7番1号 国税	
総合研究所内		庁醸造研究所内	
(72) 発明者 川戸 章嗣		F ターム (参考) 2G045 AA25 BB20 CB21 DA35 DA77	
京都市伏見区下鳥羽小柳町24 月桂冠株式		FB01	
会社総合研究所内		4B024 AA11 BA08 CA01 DA11 EA04	
		FA02 FA13 FA17 GA11 HA01	
		4B050 CC03 DD03 LL02 LL03	
		4B065 AA63X AA63Y AB01 AC14	
		AC15 BA02 CA28 CA46	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.